

REGULAÇÃO DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA PELAS CÉLULAS T NO RATO: MECANISMOS DE INTERACÇÃO CELULAR

Benedita Rocha, Ana Mafalda Cumano, António Freitas

Department of Bacteriology and Immunology. Western Infirmary. Glasgow. Scotland. Departamento de Imunologia. Faculdade de Ciências Médicas de Lisboa. Portugal.

RESUMO

Subpopulações de células T com funções *helper* ou supressora foram isoladas do baço do rato por fraccionamento em gradientes descontínuos de albumina. O estudo *in vitro* e *in vivo* da interacção destas populações celulares sugere a existência de um duplo mecanismo de *feedback* entre as células *helper* e supressoras.

INTRODUÇÃO

A resposta imunológica resulta de interacções celulares complexas nas quais têm papel fundamental os linfócitos T. No murganho podem-se individualizar três subpopulações de linfócitos T com características funcionais diferentes: As células Ly 1⁺, que colaboram com os linfócitos B na produção de Acs, (T_H, células *helper*) são responsáveis pela maior parte da resposta proliferativa na cultura mista de linfócitos e amplificam a produção de células citotóxicas; as células Ly 2⁺, 3⁺ supressoras (T_S) que inibem a resposta humoral (Snell 1978) e celular (Cantor e Boyse 1976); as células citotóxicas (T_C), Ly 2⁺, 3⁺ responsáveis pela citotoxicidade mediada por células (Cantor e Boyse 1976). Desconhece-se no entanto como estas diferentes populações celulares são activadas por um antígeno e como interactuam entre si.

Nas estirpes nas quais não foram individualizados marcadores de sub-função T, como é o caso do homem e do rato, é necessário recorrer a outros métodos de separação e identificação de linfócitos para tentar determinar se existem subpopulações T com funções diferentes.

Descrevemos anteriormente a individualização de subclasses de células T no baço do rato, obtidas por fraccionamento em gradientes de densidade. As células leves exerciam funções *helper* na resposta a mitogénios (Rocha et al 1979) e a antigénios (Rocha 1978) enquanto que as células densas mediavam efeitos supressores (Rocha 1978; Rocha et al 1979).

No presente estudo, investigámos as interacções entre as células *helper* (T_H) e supressoras (T_S). Os resultados apresentados sugerem activação sequencial das diferentes subclasses T em resposta aos antígeno e indicam a existência de múltiplos arcos de *feed-back* entre as diferentes populações celulares.

MATERIAIS E MÉTODOS

1 — Animais

Usaram-se ratos BN de ambos os sexos, de idade compreendida entre 6 e 12 semanas. Para cada experiência foram seleccionados animais do mesmo sexo e com a mesma idade.

2 — *Suspensões celulares e fraccionamento em gradientes de albumina*

As suspensões celulares de baço preparam-se em meio de Eagles a 4°C por dissociação mecânica do órgão com gaze de algodão. Os aglomerados e detritos celulares foram removidos por decantação e as células lavadas duas vezes, antes de qualquer manipulação ulterior.

A preparação de suspensões linfocitárias enriquecidas em linfócitos T fez-se por passagem em colunas de lã de nylon, segundo o método de Julius et al (1973). O número de linfócitos B nas suspensões celulares eluídas destas colunas foi determinada por imunofluorescência de membrana com soro de coelho anti-imunoglobulinas de rato, marcado com fluoresceína. Em nenhuma das experiências feitas este número foi superior a 4 % (percentagem de linfócitos B na suspensão de células de baço não fraccionadas — ± 50 %).

O fraccionamento em gradientes de albumina (BSA — Bovine Serum Albumin Fraction V, Sigma Chemical Co., St. Louis, Ms) foi feita segundo o método de Dicke et al (1969). Resumindo: Soluções de BSA com diferentes densidades (31 %, 29 %, 27 %, 25 %, 23 %, 21 %, 19 % e 17 % peso/volume) foram preparadas a partir duma solução mãe de 35 % BSA ccm o pH de 5.2 e a osmolaridade de 330 m Oms. A diluição da solução mãe foi feita em tampão fosfato com 300 m Oms de modo a introduzir nas fracções do gradiente variações de osmolaridade. As diferentes fracções foram sobrepostas em tubos de vidro e as células, resuspendidas em 17 % de albumina, colocadas no topo. Os gradientes foram então centrifugados a 2000 r.p.m. por 45 minutos a 4°C. Para que esta técnica seja reprodutível, achamos fundamental o controlo rigoroso do pH, osmolaridade e densidade de cada fracção.

Após centrifugação, as células das diferentes interfases foram recolhidas com uma pipeta de Pasteur e lavadas em grandes volumes de meio de Eagles. As células sedimentando nas interfases 17/19, 19/21 e 21/23 foram misturadas e são referidas neste texto como células leves. O pool das células sedimentando nas interfases 27/29 e 29/31 é referido como células densas.

3 — *Culturas celulares*

As células, à concentração de 2×10^6 /ml foram cultivadas em triplicado em tubos de vidro, por 72 horas a 37°C numa atmosfera com 5 % de CO₂. O meio de cultura consistia de RPMI 1640 (Flow Lab) com 10 % de FCS (Flow Lab) 4×10^{-3} M de L-glutamina (Flow Lab) 100 IU/ml de penicilina e estreptomomicina (Flow Lab) e 2×10^{-2} M de tampão Hepes (Flow Lab). Cada cultura continha 1 ml de suspensão celular. A avaliação da síntese de DNA foi feita num contador de radiações beta (Tricarb, Packard, USA) determinando a incorporação de ¹⁴C-timidina após um pulso de 24 horas com 0.1 μ Ci por cultura deste aminoácido. Os resultados são exprimidos em CPM/10⁶ células.

4 — *Células produtoras de anticorpo*

O número de células produtoras de anticorpo anti-glóbulos vermelhos de carneiro (SRBC) foi determinado usando uma modificação da técnica de placas de Jerne (Bullock e Möller 1972). As placas indirectas foram reveladas pela adição de soro de coelho anti-IgG de rato (Gibco, USA) e o seu número determinado por subtração ao número total de placas, do número de placas directas. Os resultados são exprimidos pela média de células formadoras de placas (PFC) por 10⁶ células viáveis (PFC/10⁶ células) em 3 ou mais animais.

Bloqueio da síntese proteica e da síntese de DNA

A síntese proteica das suspensões celulares estudadas foi bloqueada por incubação com 400 $\mu\text{g/ml}/10^7$ células de cicloheximida (Sigma Chemical Co.) a 37° por 30 minutos. Este tratamento reduzia a síntese proteica a 2 % da dos testemunhos.

A síntese de DNA foi totalmente inibida por incubação com 80 $\mu\text{g/ml}/10^7$ células Mitomicina-C (Sigma Chemical Co.) por 30 minutos a 37°C.

RESULTADOS

1 — *Geração dos efeitos helper e supressores in vivo*

A administração de doses supraóptimas de SRBC a ratos BN induz, nestes animais populações heterogêneas de células T com diferentes densidades (Rocha 1978). Assim, a transferência de células leves para hospedeiros singênicos aumenta a sua produção de anticorpos em resposta a uma dose óptima de antígeno. Por outro lado, a transferência de células densas suprime esta resposta (Fig. 1).

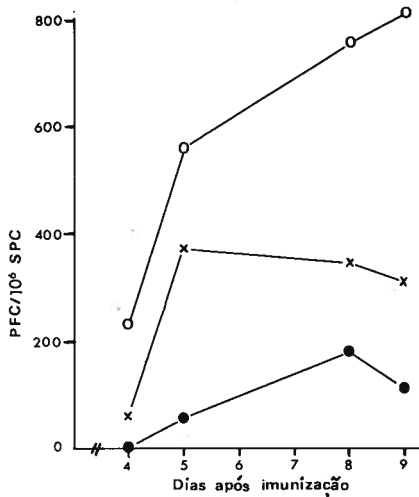


Fig. 1 — Efeito das células leves e densas na resposta aos glóbulos vermelhos de carneiro in vivo. Cada recipiente recebeu 5×10^7 células leves ou pesadas juntamente com 5×10^8 SRBC: Células leves (O) células densas (●) células não separadas de animais não imunizados (x) Os resultados são exprimidos como PFC indirectos por cada 10^6 células. Cada ponto representa a média de PFC em 3-4 ratos

Para tentar esclarecer como se originam os efeitos helper e supressores estudamos a influência da dose do antígeno na intensidade do efeito *helper* e supressor. Como se pode observar no Quadro 1 nos animais injectados com dose óptima de antígeno somente se observou geração de células *helper*. Nos animais injectados com doses supraóptimas de antígeno, não só há indução de células densas supressoras mas também a actividade *helper* das fracções leves é bastante superior à obtida em animais injectados com dose óptima de antígeno, o que pode indicar que as células supressoras são estimu-

ladas por um efeito *helper* demasiado intenso. Para averiguar esta hipótese transferimos células *helper* para animais imunizados com doses óptimas de antígeno (Fig. 2). Nestes animais formaram-se células *helper* como também células supressoras.

Quadro 1

Influência da dose de Ag na formação de células helper e supressoras

Células transferidas	Dose de antígeno (SRBC)	PFC dos recipientes 10^6 SPC	
		IgM	IgG
Não fraccionadas		114 ± 25	105 ± 30
Células leves	5×10^8	54 ± 7	289 ± 9
Células leves	5×10^9	54 ± 34	719 ± 29
Células densas	5×10^8	225 ± 47	106 ± 3
Células densas	5×10^9	119 ± 39	13 ± 3

Fraccionaram-se células T de baço de rato imunizado com 5×10^8 ou 5×10^9 SRBC. Infundiram-se 5×10^7 células leves ou densas i.v. em receptores singênicos, juntamente com 5×10^8 SRBC. Os testemunhos receberam 5×10^7 células T de animais não imunizados, juntamente com 5×10^8 SRBC. A formação de placas de hemólise foi determinada 8 dias após a transferência das células. Os resultados representam a média \pm SD de três recipientes por grupo experimental.

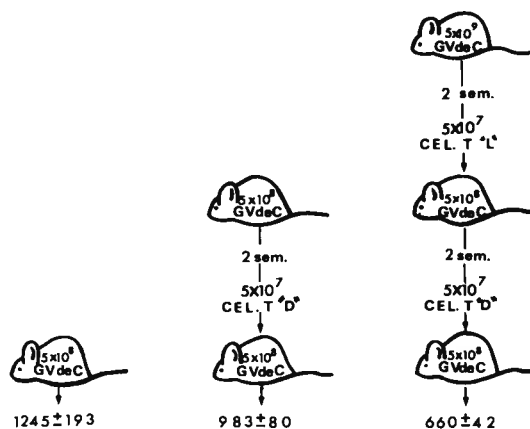


Fig. 2 — Influência das células T *helper* na geração das células T supressoras. 5×10^7 células T *helper* (leves) de animais singênicos imunizados com 5×10^9 glóbulos vermelhos de carneiro (GVC) foram transferidos para receptores singênicos subsequentemente imunizados com 5×10^8 GVC. O grupo testemunho foi também imunizado com 5×10^8 glóbulos vermelhos de carneiro. As células T densas destes dois grupos experimentais foram transferidas separadamente para receptores singênicos, subsequentemente imunizados com 5×10^8 GVC.

2 — Interação entre células helper e supressoras *in vitro*

O estudo das interações $T_H \rightleftharpoons T_S$ *in vivo* tem o inconveniente de nos ser impossível controlar no animal inteiro, a quantidade e qualidade de células que vão actuar entre si. Assim, a transferência de células reguladoras para animais normais pode desencadear nos recipientes processos de *feedback* complexos, dos quais só nos é possível determinar o resultado final. Para melhor esclarecer as interações $T_H \rightleftharpoons T_S$ recorremos a resposta *in vitro* a mitogénios. Descrevemos anteriormente que as células leves são capazes de aumentar a resposta *in vitro* a Concanavalina A das células densas. Pelo contrário, as células densas suprimem a resposta das células leves a este mitogénio (Rocha et al 1979).

A incubação de células leves ou pesadas com cicloeximida bloqueia respectivamente o efeito *helper* ou supressor (Fig. 3 e 4). O tratamento com cicloeximida no entanto induz também modificações das culturas testemunho. Assim, as culturas de células leves que contêm células tratadas com cicloeximida, têm uma resposta inferior à das células leves não tratadas (Fig. 3). Pelo contrário, as culturas de células densas que contêm células tratadas com cicloeximida respondem melhor do que as células densas não tratadas (Fig. 4).

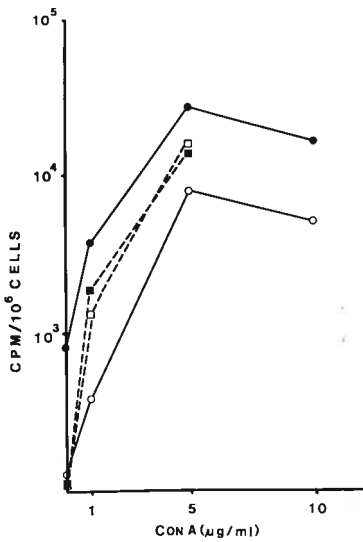


Fig. 3 — Acção da cicloeximida no efeito helper das células leves na resposta a mitogénios *in vitro*

- células densas + células densas tratadas com mitomicina
- células densas + células densas tratadas com mitomicina e cicloheximida
- células densas + células leves tratadas com mitomicina
- células densas + células leves tratadas com mitomicina e cicloeximida

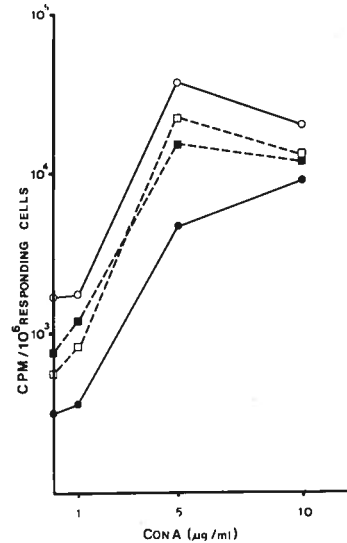


Fig. 4 — Acção da cicloeximida no efeito supressor das células densas na resposta a mitogénios *in vitro*

- células leves + células leves tratadas com mitomicina
- células leves + células leves tratadas com mitomicina e cicloheximida
- células leves + células densas tratadas com mitomicina
- células leves + células densas tratadas com mitomicina e cicloeximida

Estes resultados sugerem que células da mesma densidade também interactuam entre si, células leves aumentando a resposta de células leves e células densas suprimindo a resposta de células densas.

DISCUSSÃO

Foi previamente demonstrado que a dose de imunogénio pode determinar o domínio e de influências *helper* ou supressoras (Katz e Benacerraf 1978). Em muitos casos, no entanto, a estimulação de células supressoras é independente da dose de imunogénio (Katz e Benacerraf 1978) sugerindo que as células supressoras possam ser estimuladas por determinantes antigénicas específicas (Sercarz et al 1978) i.e. que tenham um *repertoire* diferente das células *helper*.

Neste estudo, para a indução de células supressoras é necessário a imunização com doses supraóptimas de antigénio (Quadro 1). Portanto, a estimulação das células supressoras pode resultar da interacção directa entre uma alta concentração de Ag e certas populações T. No entanto, visto que os efeitos *helper* também aumentam com a dose de antigénio (Quadro 1) a activação de células supressoras pode resultar exclusivamente dum aumento da actividade *helper*. Vários resultados experimentais indicam a existência de tal mecanismo no ratinho — a indução de actividade supressora óptima necessita da presença de células *helper* (Cantor et al 1976) que são capazes de induzir estimulação de células supressoras (Eardley et al 1978). A transferência de células *helper* para receptores singéneos permite indução de células supressoras por doses mínimas de Ag (Whisler e Stobo 1976).

O facto de que células leves do rato, tratadas com mitomicina-C amplificam a resposta das células densas à concanavalina A (Rocha et al 1979) sugere que também no rato as células *helper* podem estimular as células supressoras. Como demonstrado na Fig. 2, a transferência de células *helper* permite a formação de células supressoras em hospedeiro estimulados com doses óptimas de antigénio, nos quais normalmente só se originam células *helper* (Quadro 1).

Estes resultados sugerem que, também neste sistema, as células *helper* são capazes de induzir a formação de células supressoras. Não podemos no entanto excluir que a estimulação antigénica induza diferenciação de subpopulações de células *helper* em células supressoras no hospedeiro intermediário.

A complexidade das interacções $T_H \rightleftharpoons T_S$ é realçada pelos efeitos da ciclooximida nas culturas testemunho, que sugere a existência de interacções entre células com a mesma densidade, i.e. células densas suprimindo a resposta de células densas e células leves aumentando a resposta de células leves. Estes resultados sugerem que as interacções $T_H \rightleftharpoons T_S$ podem ser reguladas por um mecanismo de duplo *feedback* — a estimulação das células *helper* induz proliferação de células *helper* mas também de células supressoras evitando assim uma resposta imunológica excessiva. As células supressoras suprimem as células *helper* mas também inibem a sua própria proliferação impedindo assim a destruição do sistema. Tal mecanismo de *feedback* permitiria um controlo estrito da resposta celular resultante da estimulação do sistema imunológico pelos antigénios.

Agradecimentos

Agradecemos ao Biotério da Fundação Gulbenkian de Ciência, Oeiras, o fornecimento de animais para as experiências executadas em Portugal. Durante a sua estadia na Escócia, B. Rocha recebeu uma bolsa de estudo da Fundação Calouste Gulbenkian. M. J. Machado dactilografou este manuscrito.

SUMMARY

REGULATION OF T-CELL MEDIATED IMMUNE RESPONSE
IN THE RAT: MECHANISMS OF CELL-INTERACTION

The interactions between helper and suppressor spleen T lymphocytes from BN rats, isolated by fractionation in BSA density gradients were studied *in vitro* and *in vivo*. Generation of helper and suppressor cells *in vivo*, by the antigen SRBC was found to be proportional to the dose of Ag. Helper cells were shown to be able to induce feedback suppression.

Studies of the *in vitro* response to mitogens suggest that cells of the same density interact, i.e. helper cells enhance the response of helper cells while suppressor cells reduce suppressor cell mitogenic response.

BIBLIOGRAFIA

- BULLOCK WW, MÖLLER E: Spontaneous B cell activation due to loss of normal mouse serum suppressor. *Eur J Immunol* 2: 514, 1972.
- CANTOR H, BOYSE EA: Regulation of cellular and humoral immune responses by T cell subclasses. In Cold Spring Harbour Symposium on Quantitative Biology. Cold Spring Harbour Laboratory, Vol. 41, p. 23, 1976.
- CANTOR H, SHEN WF, BOYSE EA: Separation of helper T cells from suppressor T cells expressing different Ly components. II. Activation by antigen: after immunization antigen specific suppressor and helper activities are mediated by distinct T cell subclasses. *J Exp Med* 143: 1391, 1976.
- DICKE KA, TRIDENTE G, VAN BEKKUM DW: The selective elimination of immunocompetent cells from bone marrow and lymphocyte cell mixtures. III. *In vitro* test for detection of immunocompetent cells in fractionated mouse spleen cell suspensions and primate bone marrow suspensions. *Transplantation* 8: 422, 1969.
- EARDLEY DD, HUGENBERGER J, Mc VAY-BONDREAU L, SHEN FW, GERSHON RK, CANTOR H: Immunoregulatory circuits among T cell sets. I. T helper cells induce other T cell sets to exert feedback inhibition. *J Exp Med* 147: 1106, 1978.
- JULIUS M, SIMPSON E, HERZENBERG: A rapid method for the isolation of functional thymus derived murine lymphocytes. *Eur J Immunol* 3: 645, 1973.
- KATZ DH, BENACERRAF B: (eds). Immunological Tolerance—Mechanisms and potential therapeutic applications. Academic Press, London & New York, 1974.
- ROCHA B: Characterization of cell interactions in the regulation of the immune response in rats. PhD thesis, Glasgow University, 1978.
- ROCHA B, FREITAS AA, DE SOUSA M: Characterization of rat spleen cell populations. I. Cell interactions in the regulation of *in vitro* response to Concanavalin A. *Immunology* 36: 619, 1979.
- SERCARZ EE, YOWELL RL, TURKIN D, MILIER A, ARANCO BA, ADORINI L: Different functional specificity repertoires for suppressor and helper T cells. *Immunol Rev* 39: 109, 1978.
- SNELL GD: T cells, T cell recognition structures and the major histocompatibility complex. *Transplant Rev* 38: 3, 1978.
- WHISLER RL, STOBO JD: Heterogeneity of murine regulatory T cells. I. Subpopulations of amplifier and suppressor T cells. *J Exp Med* 144: 398, 1976.

Pedido de separatas: *Benedita Rocha*

Departamento de Imunologia
Faculdade de Ciências Médicas de Lisboa
Campo Santana, 130
1198 Lisboa - Portugal